

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Efeito do tratamento com o antioxidante apocinina  
no desenvolvimento e manutenção da dor  
neuropática**

**Angélica da Silva Oliveira**

**Areia, 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Efeito do tratamento com o antioxidante apocinina  
no desenvolvimento e manutenção da dor  
neuropática**

**Angélica da Silva Oliveira**

**Trabalho de conclusão de curso realizado e  
apresentado como requisito parcial para a  
obtenção do título de Bacharel em Medicina  
Veterinária pela Universidade Federal da  
Paraíba, sob orientação do Prof. Dr. Luis  
Felipe Souza da Silva.**

**Areia, 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Angélica da Silva Oliveira

**Efeito do tratamento com o antioxidante apocinina no desenvolvimento e manutenção  
da dor neuropática**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título  
de Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovada em: 06/09/2013

Nota: 10,0

**Banca Examinadora**



Prof. Dr. Luis Felipe Souza da Silva



Profa. Dra. Vanessa Martins Fayad Milken, UFPB



Médica Veterinária Karla Campô Malta, UFPB

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus pais (Miguel e Lindalva) e ao meu noivo (Vinícius) por sempre estarem ao meu lado me apoiando e principalmente acreditando em mim. Dedico também a todos familiares e amigos pelos incentivos e apoios constantes.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Quero agradecer também aos professores que me acompanharam durante a graduação, em especial aos professores Dr. Luis Felipe Souza da Silva e Dr<sup>a</sup>. Vanessa Martins Fayad Milken, responsáveis pela realização deste trabalho.

À equipe do laboratório de fisiologia, Alan Douglas, Antônio Silva, Valber Onofre, dentre outros.

Enfim, a todos que de alguma forma tornaram este caminho mais fácil de ser percorrido.

*“A compaixão pelos animais está intimamente ligada à bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem.”*

*(Arthur Schopenhauer)*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Animal sendo habituado à situação experimental .....	15
Figura 2 - Teste de Alodinia Mecânica. A: aplicação do von Frey eletrônico na região plantar do membro do animal; B: von Frey eletrônico .....	16
Figura 3 - Esquema ilustrando o protocolo experimental realizado no experimento 1 .....	17
Figura 4 - Esquema ilustrando o protocolo experimental realizado no experimento 2 .....	17
Figura 5 - Esquema ilustrando o protocolo experimental realizado no experimento 3 .....	18
Figura 6 - Representação gráfica das variações médias $\pm$ EPM, em gramas, no LRP dos animais tratados previamente com apocinina, bem como o respectivo controle (DMSO), testados 3 dias antes das injeções (3 d.a.), antes (L.B.) e em 3, 7 e 14 dias após a cirurgia .....	19
Figura 7 - Representação gráfica das variações médias $\pm$ EPM, em gramas, no LRP dos animais tratados cronicamente com apocinina, bem como o respectivo controle (DMSO), testados antes (L.B.) e em 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo controle .....	20
Figura 8 - Representação gráfica das variações médias $\pm$ EPM, em gramas, no LRP dos animais tratados tardiamente com apocinina, bem como o respectivo controle (DMSO), testados antes (L.B.) e em 3, 7, 14, 17 e 21 dias após a cirurgia. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo controle .....	21

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CCC - Constricção Crônica do Nervo Ciático

CEUA - Comissão de Ética para Uso de Animais

COBEA - Comitê Brasileiro de Experimentação Animal

DMSO - Dimetil Sulfóxido

EPM - Erro Padrão da Média

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

IASP - Associação Internacional para Estudo da Dor

LB - Linha de Base

LRP - Limiar de Retirada da Pata

RVM - Bulbo Rostralventromedial

SOD - Superóxido Desmutase



## RESUMO

OLIVEIRA, Angélica da Silva, Universidade Federal da Paraíba, setembro de 2013.

**Efeito do tratamento com o antioxidante apocinina no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática.** Orientador: Dr. Luis Felipe Souza da Silva.

A dor neuropática é considerada uma síndrome dolorosa de tratamento difícil. De acordo com diversos estudos, as espécies reativas de oxigênio (ERO) atuam normalmente nos processos celulares e seus níveis são regulados por antioxidantes. Contudo, o aumento nos níveis das ERO pode ser relacionado com o desenvolvimento e manutenção de dor persistente, como a neuropática. Adicionalmente, a lesão de nervos periféricos pode levar a um aumento na produção dessas substâncias. Tendo em vista que a administração de antioxidantes tem efeito analgésico em dores neuropáticas, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de se avaliar a participação das ERO periféricas no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática induzida pela constrição crônica do ciático (CCC), especificamente, com a finalidade de avaliar o efeito das administrações sistêmicas prévia, crônica e tardia, com o antioxidante apocinina. A administração de apocinina previamente à CCC não preveniu a hiperalgesia. Por outro lado, o tratamento crônico foi capaz de reduzir a hiperalgesia induzida pela CCC no 3º e 7º dia do experimento. O tratamento tardio reduziu a hiperalgesia no 17º dia. Assim, nossos resultados apontam para uma participação das ERO no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática. Além disso, a administração crônica pode prevenir, temporariamente, o desenvolvimento da hiperalgesia. Enquanto que o tratamento tardio pode promover uma redução leve da hiperalgesia, mesmo após a instalação da mesma.

**Palavras-chave:** alodinia; analgesia; radicais livres.

## **ABSTRACT**

OLIVEIRA, Angélica da Silva, Universidade Federal da Paraíba, september, 2013. **Effect of treatment with apocynin antioxidant in the development and maintenance of neuropathic pain.** Adviser: Dr. Luis Felipe Souza da Silva.

Neuropathic pain is considered a difficult treatment pain syndrome. According to studies, reactive oxygen species (ROS) generally modulate cellular processes and its levels are regulated by antioxidants. Conversely, increased levels of ROS may be related to the development and maintenance of persistent pain, such as neuropathic pain. Additionally, peripheral nerve injury can lead to increased production of ROS. Since the antioxidants administration has analgesic effect in neuropathic pain, the current study was conducted in order to evaluate the role of ROS in the development and maintenance of peripheral neuropathic pain induced by chronic constriction of the sciatic (CCS), specifically, we evaluated the effect of previous, chronic or delayed systemic administration of antioxidant apocynin. Administration of apocynin prior to the CCS did not prevent the development of hyperalgesia. On the other hand, chronic treatment reduced the hyperalgesia induced by CCS on the 3rd and 7th day of the experiment. The late treatment reduced the hyperalgesia on the 17th day. Thus, our results point to an involvement of ROS in the development and maintenance of neuropathic pain. In addition, chronic administration can prevent temporarily the development of hyperalgesia. While the late treatment may promote a slight decrease in hyperalgesia even after the installation of the same.

**Keywords:** allodynia, analgesia, free radicals.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>14</b>
2.1.	Animais .....	14
2.2.	Constricção Crônica do Nervo Isquiático .....	14
2.3.	Droga Utilizada .....	14
2.4.	Testes Comportamentais para Alodinia e Hiperalgesia .....	15
2.5.	Protocolos Experimentais .....	16
2.5.1.	Experimento 1: Efeito do Tratamento Prévio .....	16
2.5.2.	Experimento 2: Efeito do Tratamento Crônico .....	17
2.5.3.	Experimento 3: Efeito do Tratamento Tardio .....	17
2.6.	Análise dos Resultados .....	18
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>19</b>
3.5.	Tratamento Prévio .....	19
3.6.	Tratamento Crônico .....	20
3.7.	Tratamento Tardio .....	21
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>26</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>27</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) define a dor neuropática como sendo a “dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso” (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Esta dor dura mais que a fase inicial da lesão, podendo levar a distúrbios debilitantes que não são passíveis de terapias medicamentosas convencionalmente disponíveis (TODOROVIC; JEVTOMIC-TODOROVIC, 2013), como antiinflamatórios não esteroidais e analgésicos opióides (WOOLF; MANNION, 1999; SCHOLZ; WOOLF, 2002), por exemplo. Sendo refratária a tratamentos, a dor neuropática é considerada uma das síndromes dolorosas de mais difícil tratamento, apresentando um considerável desafio para os clínicos (DWORKIN et al., 2003; RICE; HILL, 2006) e por este motivo diversos estudos são realizados.

Dentre os principais sintomas da dor neuropática destacam-se a hiperalgesia e a alodinia (OSSIPOV; PORRECA, 2009). A hiperalgesia consiste na resposta exagerada a um estímulo doloroso, enquanto a alodinia é uma dor produzida por um estímulo normalmente inócuo (WOOLF, 2004). Estas alterações são provocadas por lesão de nervo periférico e podem ser acompanhadas por déficits sensoriais e motores (ZIMMERMANN, 2001; SOMMER, 2003).

Com a finalidade de estudar os mecanismos da dor neuropática, diferentes métodos são empregados em modelos animais (WALL et al., 1979; BENNETT; XIE, 1988; SELTZER et al., 1990), como o de constrição crônica do nervo ciático (CCC), desenvolvido por Bennett e Xie em 1988. Neste modelo os animais desenvolvem respostas comportamentais, sendo estas sugestivas de dor espontânea, tais como: autotomia, proteção do membro afetado, lambedura excessiva e deslocamento do peso corporal para o membro sadio. Além disso, quando estimulados os animais passam a apresentar hiperalgesia mecânica e térmica, bem como alodinia mecânica e ao frio (BENNETT; XIE, 1988; ATTAL et al., 1990).

Estudos demonstraram que a lesão em nervos periféricos resultou em um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (KHALIL et al., 1999; CÍZKOVÁ et al., 2002; TWINING et al., 2004; PARK et al., 2006). As ERO, ou radicais livres, têm sido implicadas em várias condições neurológicas degenerativas, como a doença de Alzheimer, de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, em disfunções cerebrais por injúria ou envelhecimento (OLANOW, 1992; COYLE; PUTTFARCKEN, 1993; BALAZS; LEON, 1994; GERLACH et al., 1994; GOTZ et al., 1994; JENNER, 1994; LEWÉN et al., 2000).

No tecido nervoso várias reações enzimáticas normais produzem ERO como subprodutos, no qual o vazamento de mitocôndrias é a principal fonte de ERO intracelular (SCHAPIRA; COOPER, 1992). Os níveis de ERO são regulados normalmente por antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos. Dentre os enzimáticos têm-se a superóxido desmutase (SOD), a glutatinoxidase e a catalase, e nos antioxidantes não enzimáticos, provenientes da dieta, têm-se as vitaminas C e E. Entretanto, em algumas situações, o aumento nos níveis de ERO resulta em lesão celular, o chamado estresse oxidativo. Este aumento pode resultar de uma maior produção de ERO ou por deficiência dos mecanismos antioxidantes de defesa. As ERO atuam nos processos celulares em condições normais, sendo originadas a partir da redução incompleta do oxigênio à água. Esta redução incompleta resulta em moléculas de oxigênio altamente reativas, principalmente na forma de ânions superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) (FRIDOVICH, 1998).

Em relação à dor neuropática, estudos demonstraram que a administração de antioxidantes tem efeito analgésico em dores desse tipo (TAL, 1996; KHALIL; KHODR, 2001; KIM et al., 2004). O tratamento com sequestradores de ERO tempol, 5,5-dimetilpirrolina-N-óxido (DMPO), edaravone ou vitamina E revertem temporariamente a alodinia desenvolvida após a ligadura realizada em nervo de ratos (KIM et al., 2004; KIM et al., 2006; MAO et al., 2009). Além disso, a CCC produziu um aumento na expressão das ERO no nervo, nos cornos dorsal e ventral da medula espinhal, bem como no gânglio da raiz dorsal (VARIJA et al., 2009).

Dentre os sistemas produtores de ERO, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) consiste num multicomponente de um sistema enzimático, expresso em vários tipos de células, que catalisa a redução de moléculas de oxigênio utilizando elétrons para formar ânions superóxido (NAUSEEF, 2008; KATSUYAMA et al., 2012; KLENIEWSKA et al., 2012). Recentemente, a NADPH oxidase vem sendo implicada no desenvolvimento de sensibilização central associada à hiperalgesia inflamatória (IBI et al., 2008), sendo mais expressada em células imunitárias e em leucócitos, entretanto sabe-se que vários componentes proteicos da NADPH oxidase são expressos em neurônios, astrócitos e microglia (GREEN, 2001; ABRAMOV, et al., 2004; TEJADA-SIMON, et al., 2005). Este complexo enzimático possui subunidades múltiplas, que em condições normais segregam para o citoplasma e compartimentos da membrana plasmática. Em resposta a estímulos, as subunidades citosólicas ( $p47^{PHOX}$ ,  $p67^{PHOX}$  e  $p40^{PHOX}$ ) translocam-se para a membrana e se

associam com componentes desta (gp91<sup>PHOX</sup> e p22<sup>PHOX</sup>) para montar a oxidase funcional e, posteriormente, liberar radical superóxido livre (DELEO; QUINN, 1996; BABIOR, 1999).

A apocinina (4'-hidroxi-3'methoxiacetofenona) impede a fosforilação da serina p47<sup>PHOX</sup>, bloqueando sua associação com gp91<sup>PHOX</sup>, reduzindo assim, a ativação da NADPH oxidase (SIMONS et al., 1990; STOLK et al., 1994). Têm-se utilizado a apocinina como uma das drogas mais promissoras em modelos experimentais de doenças nas quais há o envolvimento de ERO, como por exemplo, em patologias vasculares, inflamatórias e neurodegenerativas (PETRÔNIO et al., 2013). No estudo realizado por KIM *et al.* (2013) foi demonstrado que a apocinina ao ser administrada por via intraperitoneal, durante quatro dias, na dose de 30mg/kg, possui um efeito neuroprotetor em ratos. TIM *et al.* (2010) mostraram que a apocinina age sobre a NADPH oxidase, atenuando a hiperalgesia induzida, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, sendo este efeito maior à medida que se aumenta a dose.

Diante do que foi exposto, diversos estudos sugerem que um aumento nas ERO está associado ao desenvolvimento da dor neuropática. Desta forma, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de se avaliar a participação das ERO periféricas no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática induzida pela CCC, especificamente, avaliar o efeito das administrações sistêmicas prévia, crônica e tardia, do antioxidante apocinina, no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Animais**

Para a realização dos procedimentos foram utilizados 45 ratos Wistar, pesando entre 200 e 250 gramas (g). Os animais ficaram alojados em grupos de seis, em caixas plásticas, alimentados com ração granulada e água *ad libitum*, sendo o ciclo claro-escuro de 12 horas (início do período claro às 06:00 horas) e com a temperatura controlada. Todos os protocolos experimentais realizados estavam de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação em animais de laboratório, estabelecidos pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba.

### **2.2. Constrição Crônica do Nervo Isquiático**

A CCC consiste num procedimento utilizado com a finalidade de retardar a vascularização perineural, sendo esta realizada a partir de uma constrição no nervo isquiático dos animais. Esta lesão foi realizada como o modelo descrito por Bennett e Xie em 1988. Para a execução dos procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados previamente, por via intraperitoneal, com uma associação de cloridrato de cetamina (75 mg/Kg) e xilazina (20 mg/kg). Após o procedimento anestésico foram feitas tricotomia e antisepsia com álcool iodado no local da incisão, sendo esta realizada na porção média da coxa esquerda, e em seguida, a dissecação do bíceps femoral para exposição do nervo. Ao ser exposto, a trifurcação existente no nervo isquiático foi localizada, e a partir desta foram feitas quatro ligaduras com fios de algodão (4.0) em torno do nervo com aproximadamente um milímetro de espaçamento entre elas. Finalmente, a incisão foi suturada com fios de algodão (4.0) e uma nova antisepsia foi realizada. Vale ressaltar que os animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, entretanto não receberam o tratamento com antioxidante. Logo após, os animais operados foram colocados em caixas individuais com água e ração *ad libitum*, até que se recuperassem da anestesia, e depois foram transferidos para as caixas onde estavam alojados anteriormente, com os outros animais.

### **2.3. Droga Utilizada**

Com a finalidade de reverter o efeito da CCC, no presente estudo foi utilizado o antioxidante 4'-hidroxi-3-methoxiacetofenona (apocinina; Sigma), na dose de 60 mg/kg,

dissolvido em partes iguais de solução fisiológica estéril [NaCl 154 mM (0,9%)] e dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma). A diluição da apocinina em DMSO foi administrada nos animais do grupo tratado, já o grupo controle recebeu apenas DMSO associado à solução fisiológica, em partes iguais. Em todos os protocolos a administração de apocinina ou DMSO foi realizada por via intraperitoneal.

#### **2.4. Testes Comportamentais para Alodinia e Hiperalgisia**

Para a realização dos testes comportamentais os animais foram colocados em compartimentos de vidro, com 15 cm de altura x 15 cm de largura x 20 cm de comprimento, sobre uma tela de metal (FIGURA 1), a qual permitiu o acesso à região plantar dos membros dos animais. Estes foram previamente habituados a essa situação experimental, durante 30 minutos, por dois dias, antes do início dos testes comportamentais, porém nenhum teste foi realizado. No dia do experimento, os animais foram habituados, também por 30 minutos e, na sequência, foram testados para alodinia mecânica.

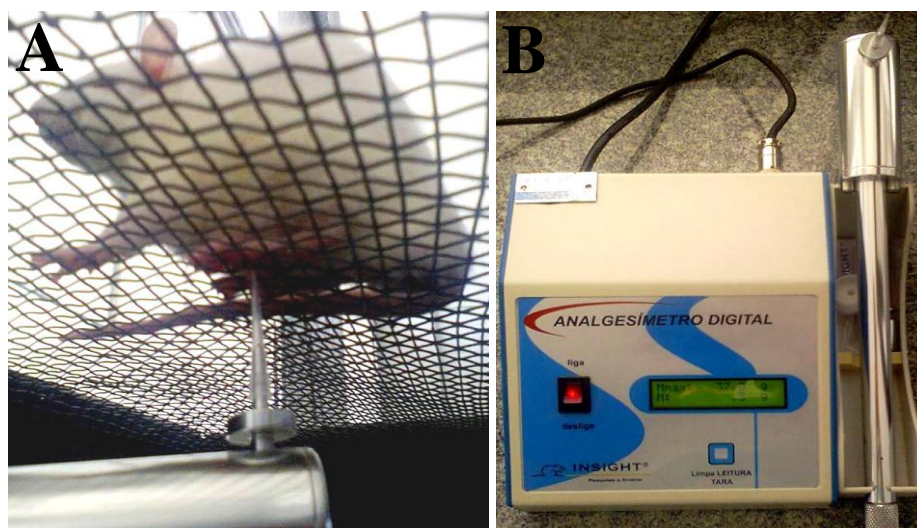


**Figura 1.** Animal sendo habituado à situação experimental.

A alodinia mecânica foi avaliada por meio da aplicação do von Frey eletrônico na região plantar dos membros dos animais (FIGURA 2, A). O von Frey eletrônico consiste em um equipamento capaz de registrar a força exata aplicada sobre uma ponteira de polipropileno



conectada a ele (FIGURA 2, B). Esta ponteira é aplicada perpendicularmente à área central e plantar, com um aumento gradual na pressão aplicada até que o animal retire seu membro da origem do estímulo (VIVANCOS et al., 2004). A pressão em gramas registrada automaticamente no equipamento foi considerada como sendo o limiar de retirada da pata (LRP). A redução no LRP foi considerada como hipersensibilidade ou alodinia cutânea e o aumento como analgesia cutânea.



**Figura 2.** Teste de Alodinia Mecânica. A: aplicação do von Frey eletrônico na região plantar do membro do animal; B: von Frey eletrônico.

## 2.5. Protocolos Experimentais

### 2.5.1. Experimento 1: Efeito do Tratamento Prévio

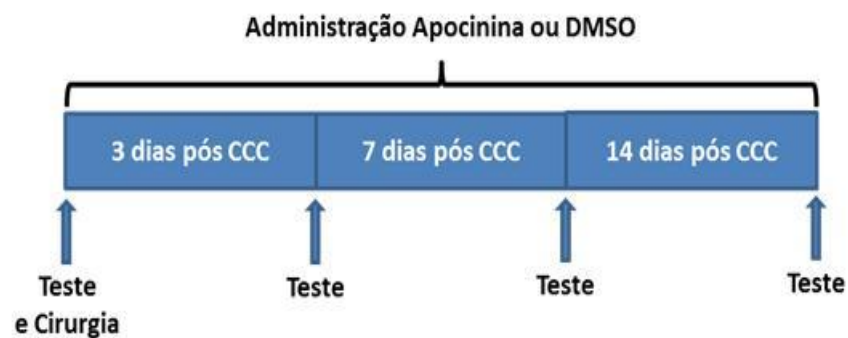
Os animais foram divididos em dois grupos de seis e submetidos à CCC, recebendo injeções de DMSO (grupo controle) ou apocinina (grupo tratado), durante três dias, sendo no 3º dia submetidos à cirurgia de CCC. Os testes comportamentais (descritos anteriormente) foram realizados previamente às injeções, antes da cirurgia (a chamada linha de base, LB) e no 3º, 7º e 14º dia após a sua realização (FIGURA 3).



**Figura 3.** Esquema ilustrando o protocolo experimental realizado no experimento 1.

### 2.5.2. Experimento 2: Efeito do Tratamento Crônico

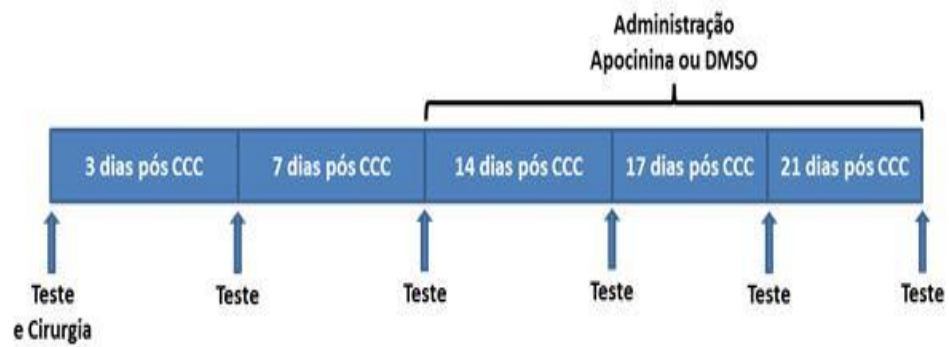
Os animais foram divididos em dois grupos, um contendo nove (grupo controle) e outro seis (grupo tratado). Estes foram submetidos à CCC, recebendo injeções diárias de DMSO ou apocinina, a partir do primeiro dia pós-cirúrgico, por todo período experimental, excetuando-se o último dia. Os testes comportamentais foram realizados previamente à cirurgia (LB) e no 3º, 7º e 14º dia após a sua realização (FIGURA 4).



**Figura 4.** Esquema ilustrando o protocolo experimental realizado no experimento 2.

### 2.5.3. Experimento 3: Efeito do Tratamento Tardio

Os animais foram divididos em dois grupos de nove e submetidos à CCC, recebendo injeções de DMSO (grupo controle) ou apocinina (grupo tratado), por sete dias, a partir do 14º dia pós-cirúrgico. Os testes comportamentais foram realizados previamente à cirurgia (LB) e no 3º, 7º, 14º, 17º e 21º dia após a sua realização (FIGURA 5).



**Figura 5.** Esquema ilustrando o protocolo experimental realizado no experimento 3.

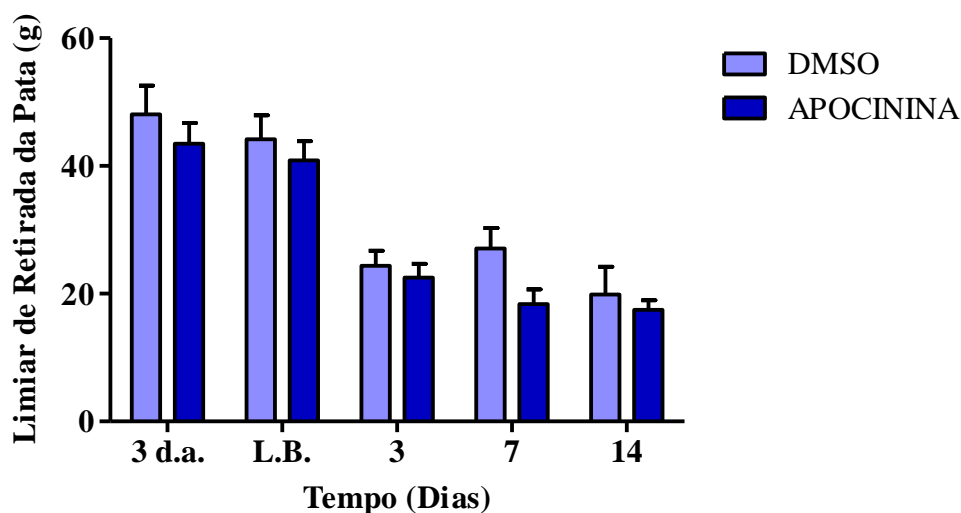
## 2.6. Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos em valores médios  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). Para análise dos testes algesimétricos foi utilizada uma análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) para medidas repetidas, em que as variáveis foram o tempo (fator repetido) e o tratamento (fator independente), seguido por um pós-teste de Tukey para avaliar as diferenças entre os grupos. Os dados foram considerados estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Tratamento Prévio

No experimento 1 a CCC produziu uma hiperalgesia nos animais do grupo controle a partir do 3º dia após a cirurgia (FIGURA 6), indicada por uma redução no LRP, de  $44,18\text{g} \pm 3,47\text{g}$  na medida basal para  $24,37\text{g} \pm 2,16\text{g}$ . Esta redução permaneceu por todo o experimento, sendo a medida no 7º dia de  $27,09\text{g} \pm 2,94\text{g}$  e de  $19,86\text{g} \pm 4,04\text{g}$  no 14º dia. O tratamento prévio com apocinina não foi capaz de prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia, uma vez que nos animais tratados também foi verificada a presença de hiperalgesia após a cirurgia (FIGURA 6). Neste grupo o LRP na medida basal foi de  $40,88\text{g} \pm 2,77\text{g}$ , reduzindo no 3º e 7º dia para  $22,52\text{g} \pm 1,99\text{g}$  e  $18,35\text{g} \pm 2,17\text{g}$ , respectivamente, apresentando como medida no 14º dia  $17,46\text{g} \pm 1,39\text{g}$ . A aplicação do teste estatístico não mostrou haver diferença significativa entre os grupos controle e apocinina ( $p > 0,05$ ).



**Figura 6.** Representação gráfica das variações médias  $\pm$  EPM, em gramas, no LRP dos animais tratados previamente com apocinina, bem como o respectivo controle (DMSO), testados 3 dias antes das injeções (3 d.a.), antes (L.B.) e em 3, 7 e 14 dias após a cirurgia.

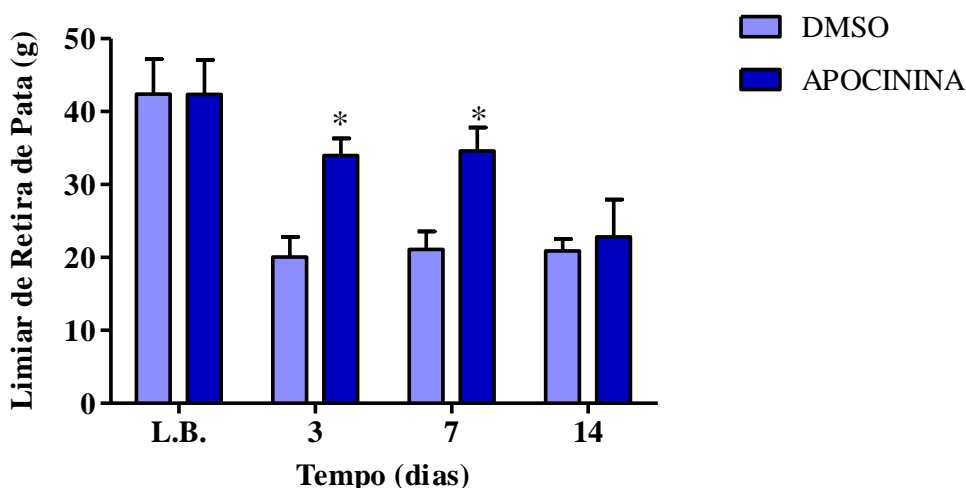
Tendo em vista que a NADPH oxidase tem sido recentemente implicada no desenvolvimento de sensibilização central, associada à hiperalgesia inflamatória e que a apocinina diminui a ativação da NADPH oxidase (SIMONS et al., 1990; STOLK et al., 1994), viu-se a possibilidade deste antioxidante atuar, de certa forma, como analgésico, interferindo assim nas medidas basais do LRP. Levando esta hipótese em consideração, também foi realizado um teste de alodinia mecânica antes de se iniciar o tratamento,

entretanto não houve diferença estatística ao realizar a comparação (FIGURA 6). No grupo controle a medida três dias antes da cirurgia foi de  $45,51\text{g} \pm 4,15\text{g}$  e no dia da cirurgia foi de  $44,18 \pm 3,47$ . Em relação ao grupo tratado, a primeira medida foi de  $43,47\text{g} \pm 3,02$  e  $40,88\text{g} \pm 2,77\text{g}$  a obtida três dias após as injeções.

Neste sentido, os resultados do presente trabalho indicam que a CCC foi capaz de induzir a dor neuropática nos animais. Entretanto, o tratamento prévio com apocinina foi incapaz de prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia.

### 3.2. Tratamento Crônico

No experimento 2, novamente a CCC produziu uma redução significativa no LRP (FIGURA 7), passando de  $42,39\text{g} \pm 5,46\text{g}$ , na medida basal, para  $20,07\text{g} \pm 3,11\text{g}$  no teste realizado três dias após a cirurgia,  $21,10\text{g} \pm 2,79\text{g}$  no 7º dia e  $20,91 \pm 1,84\text{g}$  no 14º dia nos animais do grupo controle. Os resultados do tratamento crônico mostraram que a administração sistêmica de apocinina reduziu a hiperalgesia produzida pela CCC (FIGURA 7). Os valores do LRP dos animais tratados com apocinina foram de  $42,35\text{g} \pm 4,40\text{g}$  na medida basal, reduzindo para  $34,00\text{g} \pm 2,13\text{g}$  no 3º dia após a cirurgia e  $34,60\text{g} \pm 2,98\text{g}$  no 7º dia, no 14º dia os animais apresentaram uma redução no LRP atingindo valores de  $22,80\text{g} \pm 4,76\text{g}$ . A análise estatística mostrou uma diferença significativa entre os grupos apocinina e DMSO nas medidas do 3º e 7º dia ( $p < 0,05$ ).



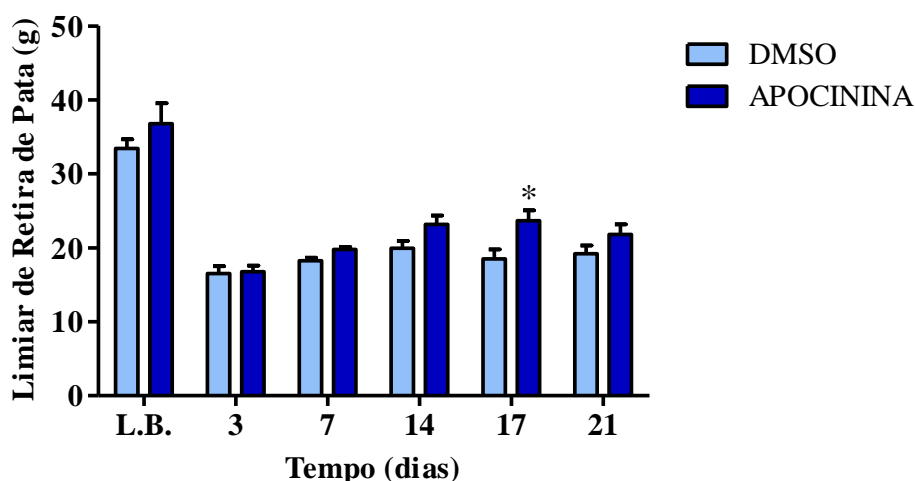
**Figura 7.** Representação gráfica das variações médias  $\pm$  EPM, em gramas, no LRP dos animais tratados cronicamente com apocinina, bem como o respectivo controle (DMSO), testados antes (L.B.) e em 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. \*  $P < 0,05$  em comparação com o grupo controle.

Assim, nossos resultados sugerem que na primeira semana após a lesão do nervo, o tratamento crônico com apocinina é capaz de prevenir o desenvolvimento da dor neuropática. Contudo, após 14 dias mesmo com o tratamento crônico houve a instalação de dor neuropática.

### 3.3. Tratamento Tardio

Como visto anteriormente nos outros protocolos experimentais, a CCC foi capaz de induzir a hiperalgesia. Esta foi observada em ambos os grupos deste experimento (FIGURA 8). No grupo controle a medida do LRP basal foi de  $33,43g \pm 1,42g$ , reduzindo no 3º dia após a cirurgia para  $16,51g \pm 1,16g$ , no 7º dia o LRP foi de  $18,24g \pm 0,47g$ ,  $19,97g \pm 1,10g$  no 14º dia, no 17º foi de  $18,49g \pm 1,47g$  e no último dia de  $19,22g \pm 1,25g$ .

No grupo tratado com apocinina o LRP dos animais na medida basal foi de  $36,78g \pm 3,12g$ , a partir do 3º dia houve uma queda no LRP para  $16,76g \pm 0,96g$  e esta se manteve no sétimo dia ( $19,78g \pm 0,36g$ ). No 14º dia, após o início da administração da apocinina, foi observado um leve aumento no LRP, sendo a medida  $23,18g \pm 1,32g$ , este aumento atingiu valores estatisticamente significativos no 17º dia, sendo o LRP de  $23,64g \pm 1,62g$  ( $p < 0,05$ ). Contudo no 21º dia houve uma redução no LRP para  $21,79g \pm 1,54g$ .



**Figura 8.** Representação gráfica das variações médias  $\pm$  EPM, em gramas, no LRP dos animais tratados tardiamente com apocinina, bem como o respectivo controle (DMSO), testados antes (L.B.) e em 3, 7, 14, 17 e 21 dias após a cirurgia. \*  $P < 0,05$  em comparação com o grupo controle.

Desta forma, os resultados do presente experimento indicaram que o tratamento com antioxidante após a instalação da dor neuropática pode reduzir a hiperalgesia, entretanto essa redução ocorre apenas nos primeiros dias de tratamento.

#### 4. DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, através do teste para avaliação da alodinia mecânica, é possível afirmar que no 1º protocolo experimental a CCC induziu hiperalgesia em ambos os grupos e que o tratamento prévio com antioxidante não impediu a instalação da mesma. Por outro lado, o tratamento crônico foi capaz de amenizar o desenvolvimento da dor neuropática no 3º e 7º dia após a lesão do nervo. No caso do tratamento tardio a administração de apocinina foi realizada em animais que já apresentavam a dor neuropática completamente instalada, sendo capaz de reduzir a hiperalgesia apenas nos três primeiros dias de tratamento.

Os resultados sugerem que o bloqueio prévio na formação das ERO pela administração do antioxidante apocinina não interfere no aparecimento da dor neuropática induzida pela CCC. Assim, é provável que as ERO não estejam envolvidas com as alterações que ocorrem durante a lesão e que seriam responsáveis pelo surgimento da dor neuropática. Contudo, alguns estudos mostram o impedimento da hiperalgesia de forma prévia, mas a partir do bloqueio das sinapses excitatórias no bulbo rostralventromedial (RVM), antes da lesão do nervo isquiático, retardando o desenvolvimento da dor neuropática (WEI; PERTOVAARA, 1999; SANOJA et al., 2008). O tratamento com substâncias que removem os radicais superóxido é eficaz no alívio da hiperalgesia em ratos com CCC (TAL, 1996). De acordo com estes estudos, nos quais é possível retardar a dor tratando previamente e que o uso de antioxidantes é eficaz, juntamente com a hipótese de que quando as ERO foram produzidas a partir da CCC, o tratamento antioxidante já estava presente, atuando sobre estas espécies reativas, sequestrando-as e, conseqüentemente, reduzindo a hiperalgesia que a dor neuropática pode provocar, acreditava-se na eficácia deste tipo de tratamento, o que não foi possível.

Provavelmente as ERO participam da dor neuropática não no início, mas sim durante o seu desenvolvimento e outros mecanismos, além das ERO, parecem estar envolvidos na dor neuropática, como os ligados à inflamação. Em casos de inflamação pode ocorrer uma resposta imune aberrante, resultando numa neuroinflamação excessiva do sistema nervoso periférico ou do sistema nervoso central, tendo estes como exemplos a síndrome de Guillain-Barré e a esclerose múltipla, respectivamente (SOLARO et al., 2004; RUTS et al., 2010). A neuroinflamação tem sido implicada de maneira crescente na patogênese da dor neuropática, como um componente integrante do progressivo processo neurodegenerativo, bem como tem sido detectado com frequência em pacientes com este tipo de dor e em modelos animais experimentais (GAO et al., 2003). Além disso, diversas causas de dor neuropática (como por



exemplo, a neuropatia traumática e a lesão da medula espinhal) estão, em si, associadas à inflamação excessiva, que pode estar envolvida tanto na iniciação como na manutenção da dor persistente (ELLIS; BENNETT, 2013). Entretanto a NADPH oxidase tem sido implicada no desenvolvimento de sensibilização central associada à hiperalgesia inflamatória e, a apocinina diminui a ativação da NADPH oxidase (SIMONS et al., 1990; STOLK et al., 1994).

No tratamento crônico pode-se perceber a eficácia da apocinina no 3º e 7º dia após a CCC, sugerindo que esta droga atuou em mecanismos envolvidos com o início da dor neuropática (efeito sobre a inflamação), bem como no desenvolvimento desta dor (atuando sobre as ERO), já que a apocinina age sobre a NADPH oxidase e esta está relacionada com a hiperalgesia inflamatória, sendo um sistema produtor de ERO. É necessário ressaltar que no 14º dia após a CCC a hiperalgesia foi desenvolvida. Provavelmente este tratamento foi capaz de retardar o acúmulo das ERO, impedindo provisoriamente o desenvolvimento da hiperalgesia, entretanto não foi capaz de eliminá-la completamente. É possível que o sequestro de ERO tenha ocorrido, porém não foi suficiente para sequestrar todas as ERO produzidas. Este excedente pode ter se acumulado lentamente até atingir um provável limiar necessário para o desenvolvimento da hiperalgesia. Outra possível interpretação para estes dados é a de que o acúmulo das ERO pode levar ao desenvolvimento de dor neuropática a qualquer momento, enquanto a lesão no nervo não seja curada totalmente. O efeito temporário pode ser visto em outros estudos (KIM et al., 2004; KIM et al., 2006; MAO et al., 2009), nos quais o tratamento com sequestradores de ERO tempol, 5,5-dimetilpirrolina-N-óxido (DMPO), edaravone ou vitamina E, reverteram temporariamente a alodinia desenvolvida após a ligadura de nervo em ratos. Possivelmente, com a manutenção da lesão no nervo ocorreu o desenvolvimento tardio da hiperalgesia, o que denota que as ERO podem participar também na manutenção do processo doloroso crônico iniciado pela constrição do nervo isquiático.

Um ponto importante que merece destaque foi o fato de que no tratamento prévio não se observou o efeito da administração da apocinina, contrário do ocorrido no crônico, iniciado no primeiro dia após a CCC e, este último tratamento estava relacionado com a inflamação. Desta forma, o esperado era que tratar previamente os animais fosse eficaz, também, sobre a inflamação, mas, de acordo com um estudo recente experimentos futuros devem ser feitos para a caracterização completa da farmacocinética da apocinina e de seus parâmetros como a biodisponibilidade, distribuição, excreção, dentre outros (PETRÔNIO et al., 2013).

Como já dito anteriormente, as ERO parecem participar no desenvolvimento da dor neuropática e esta hipótese pode ser confirmada ao observar os resultados do tratamento tardio. Neste protocolo experimental a hiperalgesia provocada pela CCC foi revertida, entretanto temporariamente, como discutido no segundo protocolo experimental, com os estudos de Kim *et al.* (2004); Kim *et al.* (2006); Mao *et al.* (2009), já que no último dia do experimento (21º dia) não houve diferença significativa no LRP. Estes estudos sugerem que ERO excessivas podem estar envolvidas na dor neuropática em sua geração e desenvolvimento, sendo esta hipótese semelhante aos resultados obtidos aqui.

Varija *et al.* (2009) mostraram em um estudo que após sete dias da realização da CCC ocorreu a presença significativa de hiperalgesia, e esta se manteve até o final do experimento. Neste mesmo estudo também foi verificado que as ERO, bem como as enzimas removedoras destas (como a SOD e a glutathione peroxidase), estavam aumentadas no nervo isquiático, na medula espinhal, na raiz dorsal e ventral, sendo este aumento observado após o término do experimento, com 30 dias. Nesse mesmo estudo foi concluído que as ERO desempenham um papel importante na dor neuropática.

No estudo de Petrônio *et al.* (2013) foi demonstrado que a apocinina é uma droga captadora de radicais livres relativamente fraca e como já dito anteriormente, experimentos futuros devem ser realizados para a caracterização completa de sua farmacocinética e de seus parâmetros como a biodisponibilidade, distribuição, excreção, dentre outros. Além disso, é necessário determinar exatamente onde é/são o(s) sítio(s) de ação da apocinina. Em trabalho realizado com fenil N-terc-butylnitrone (PBN) e 5,5-dimethylpyrroline-N-óxido (DMPO) interpretou-se que estes reagentes estavam atuando principalmente na medula espinhal, mas que também tinham uma ação em regiões supra-espinhais. Assim, um efeito máximo será produzido pela administração sistêmica dos agentes que atravessem a barreira hematoencefálica e, portanto, atuam tanto a nível espinhal quanto a nível supra-espinhal (KIM *et al.*, 2004).

## **5. CONCLUSÃO**

Diante do exposto, pode-se concluir que as ERO atuam no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática. A administração sistêmica crônica do antioxidante apocinina previne, temporariamente, o desenvolvimento da hiperalgesia causada pela CCC. Além disso, a administração tardia, após a instalação da dor neuropática, é capaz de reverter a hiperalgesia nos primeiros dias de tratamento.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMOV, A. Y.; CANEVARI, L.; DUCHEN, M. R. Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 24, n. 2, p. 565-575, jan. 2004.
- ATTAL, N. et al. Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. **Pain**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 235-251, may. 1990.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, New York, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, mar. 1999.
- BALAZS, L.; LEON, M. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. **Neurochemical Research**, New York, v. 19, n. 9, p.1131-1137, sep. 1994.
- BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 87-107, apr. 1988.
- CÍZKOVÁ, D. et al. Neuropathic pain is associated with alterations of nitric oxide synthase immunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn. **Brain Research Bulletin**, New York, v. 58, n. 2, p. 161-171, jun. 2002.
- COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, New York, v. 262, n. 5134, p. 689-695, oct. 1993.
- DELEO, F. R.; QUINN, M. T. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. **Journal of leukocyte biology**, New York, v. 60, n. 6, p. 677-691, dec. 1996.
- DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Archives of Neurology**, Chicago, v. 60, n. 11, p. 1524-1534, nov. 2003.
- ELLIS, A.; BENNETT, D. L. H. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. **British Journal of Anaesthesia**, London, v. 111, n. 1, p. 26-37, jul. 2013.
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 201, p. 1203-1209, mar. 1998.
- GAO, H. M.; LIU, B.; HONG, J. S. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **The Journal of neuroscience**, Baltimore, v. 23, n. 15, p. 6181-6187, jul. 2003.
- GERLACH, M. et al. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? **Journal of Neurochemistry**, New York, v. 63, n. 3, p. 793-807, sep. 1994.
- GOTZ, M. et al. Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. **Pharmacology & Therapeutics**, New York, v. 63, n. 1, p. 37-122, 1994.

GREEN, S. P. et al. Curnutte, Induction of gp91-phox, a component of the phagocyte NADPH oxidase, in microglial cells during central nervous system inflammation. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, New York, v. 21, n. 4, p. 374-384, apr. 2001.

IBI, M. et al. Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 28, n. 38, p. 9486-9494, sep. 2008.

JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. **The Lancet**, London, v. 344, n. 8925, p. 796-798, sep. 1994.

KATSUYAMA, M.; MATSUNO, K.; YABE-NISHIMURA, C. Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, Mitake, v. 50, n. 1, p. 9-22, jan. 2012.

KHALIL, Z.; KHODR, B. A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, n. 4, p. 430-439, aug. 2001.

KHALIL, Z.; LIU, T.; HELME, R. D. Free radicals contribute to the reduction in peripheral vascular responses and the maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury. **Pain**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 31-37, jan. 1999.

KIM, H. K. et al. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. **Pain**, Amsterdam, v. 122, p. 53-62, may. 2006.

KIM, H. K. et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, Amsterdam, v. 111, p. 116-124, sep. 2004.

KIM, J. E. et al. Post-treatment of an NADPH oxidase inhibitor prevents seizure-induced neuronal death. **Brain research**, Amsterdam, v. 1499, p. 163-172, mar. 2013.

KLENIEWSKA, P. et al. The NADPH oxidase family and its inhibitors. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Warszawa, v. 60, n. 4, p. 277-294, aug. 2012.

LEWÉN, A.; MATZ, P.; CHAN, P. H. Free radical pathways in CNS injury. **Journal of Neurotrauma**, New York, v. 17, n. 10, p. 871-890, oct. 2000.

MAO, Y. F. et al. Edaravone, a free radical scavenger, is effective on neuropathic pain in rats. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1248, p. 68-75, jan. 2009.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms**. 2 ed. Seattle: IASP Press, 1994. 222p.

NAUSEEF, W.M. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 25, p. 16961-16965, jun. 2008.

OLANOW, C. W. An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, Boston, v. 32, p. S2-S9, 1992.

OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Neuropathic Pain: Basic Mechanisms (Animal). In BASBAUM, A. I.; BUSHNELL, M. C. **Science of Pain**. San Diego: Elsevier, 2009. p. 833-848.

PARK, E. S. et al. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 391, n. 3, p. 108-111, jan. 2006.

PETRÔNIO, M. S. et al. Apocynin: Chemical and Biophysical Properties of a NADPH Oxidase Inhibitor. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 3, p. 2821-2839, mar. 2013.

RICE, A.S. C.; HILL, R. G. New treatments for neuropathic pain. **Annual Reviews of Medicine**, Palo Alto, v. 57, p. 535-551, feb. 2006.

RUTS, L. et al. Pain in Guillain-Barre syndrome: a long-term follow-up study. **Neurology**, Minneapolis, v. 75, n. 16, p. 1439-1447, oct. 2010.

SANOJA, R.; VANEGAS, H.; TORTORICI, V. Critical role of the rostral ventromedial medulla in early spinal events leading to chronic constriction injury neuropathy in rats. **The journal of pain**, Philadelphia v. 9, n. 6, p. 532-542, jun. 2008.

SCHAPIRA, A. H.; COOPER, J. M. Mitochondrial function in neurodegeneration and aging. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 275, p. 1133-1143, sep. 1992.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, New York, v. 5, n. 942, p. 1062-1067, oct. 2002.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 205-218, 1990.

SIMONS, J. M. et al. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 8, n. 3, p. 251-258, 1990.

SOLARO, C. et al. The prevalence of pain in multiple sclerosis: a multicenter cross-sectional study. **Neurology**, Minneapolis, v. 63, n. 5, p. 919-921, sep. 2004.

SOMMER, C. Painful neuropathies. **Current Opinion in Neurology**, Philadelphia, v. 16, p. 623-628, oct. 2003.

STOLK, J. et al. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, amethoxy-substituted catechol. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, New York, v.11, n. 1. p. 95-102, jul. 1994.

TAL, M. A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. **NeuroReport**, London, v. 7, n. 8, p. 1382-1384, may.1996.

TEJADA-SIMON, M. V. et al. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. **Molecular and cellular neurosciences**, San Diego v. 29, n. 1, p.97-106, may. 2005.

TIM D. et al. Spinal NADPH oxidase is a source of superoxide in the development of morphine-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance. **Neuroscience letters**, Amsterdam, v. 483, n. 2, p. 85-89, oct. 2010.

TODOROVIC, S. M.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V. Neuropathic pain: role for presynaptic T-type channels in nociceptive signaling. **Pflügers Archiv: European journal of physiology**, Berlim, v. 465, n. 7, p. 921-927, jul. 2013.

TWINING, C. M. et al. Peri-sciatic proinflammatory cytokines, reactive oxygen species, and complement induce mirror-image neuropathic pain in rats. **Pain**, Amsterdam, v. 110, p. 299-309, jul. 2004.

VARIJA, D. et al. Prolonged constriction of sciatic nerve affecting oxidative stressors & antioxidant enzymes in rat. **The Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 129, n. 5, p. 587-592, may. 2009.

VIVANCOS, G. G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 391-399, mar. 2004.

WALL, P. D. et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. **Pain**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 103-111, oct. 1979.

WEI, H.; PERTOVAARA, A. MK-801, an NMDA receptor antagonist, in the rostroventromedial medulla attenuates development of neuropathic symptoms in the rat. **Neuroreport**, v. 10, n. 14, p. 2933-2937, sep. 1999.

WOOLF, C. J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: Implications for diagnosis and therapy. **Life Sciences**, New York, v.74, n. 21, p.2605-2610, apr. 2004.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **The Lancet**, London, v. 353, n. 9168, p. 1959-1964, jun. 1999.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal Pharmacology**, Amsterdam, v. 429, p. 23-37, oct. 2001.